



関西学院大学リポジトリ

Kwansei Gakuin University Repository

アデノウイルスE1Aによりがん性変化を起こした細胞におけるE2F3の発現制御機構と機能解析

著者	服部 拓
発行年	2017
URL	http://hdl.handle.net/10236/00027147

アデノウイルス E1A によりがん性変化を起こした細胞における E2F3 の発現制御機構と機能解析

大谷研究室 服部 拓

【研究目的】 E2F は細胞周期進行に関わる遺伝子等の発現を制御している転写因子で、8 つのファミリーメンバー (E2F1~E2F8) が存在する。G1 期において、E2F の活性は RB ファミリータンパク質が結合することで抑制されている。増殖刺激が加わるとサイクリン依存性キナーゼ (CDK) により RB ファミリータンパク質がリン酸化され、リン酸化された RB は E2F に結合出来なくなり、E2F 標的遺伝子の発現が誘導されることで細胞周期は G1 期から S 期へ進行する。多くのがん細胞において RB の機能が欠損する異常が見つかっており、RB の抑制を外れて恒常的に活性化された E2F は細胞周期を無秩序に進行させる。また、それと同時にアポトーシス関連遺伝子の発現も誘導する。

E2F3 には 1 番目のエキソンの違いから 2 つのアイソフォーム (E2F3a と E2F3b) があり、E2F3a は細胞増殖に重要な働きをもっている。多くのがん細胞において悪性度と E2F3 の発現量に相関性が見られることから、E2F3 は、がんの悪性度を診断するうえで遺伝子バイオマーカーとして用いられている。しかし、がん性変化によって E2F3 の発現がどのように制御されているのかはよく分かっていない。本研究は、「がん性変化の起きた細胞において E2F3 の発現がどのように制御されており、E2F 標的遺伝子の発現誘導にどのような役割を果たしているか」を明らかにすることを目的とする。

【実験方法】細胞は、ヒト正常線維芽細胞 (Human Foreskin Fibroblast; HFF)を用いた。RB の機能欠損 (がん性変化) は、RB と結合して不活性化するアデノウイルス E1A を HFF に安定発現させ、誘導した。作製した細胞における mRNA 量とタンパク質量の変化は、qRT-PCR 法とウエスタンブロッティング法によって解析した。mRNA とタンパク質の安定性の解析は、転写阻害剤アクチノマイシン D とプロテアソーム阻害剤 MG132 を用いた。E2F3a と E2F3b のプロモーター活性は、レポーターアッセイで測定した。標的遺伝子の発現制御における E2F3 の役割は、siRNA を用いて E2F3 をノックダウンして解析した。

【実験結果と考察】 HFF に E1A を導入し、RB を不活性化した細胞における E2F3 タンパク質の発現を調べたところ、E2F3a と E2F3b の発現量が共に増加した。mRNA 量の変化を調べたところ、E1A を導入することで E2F3a が約 3 倍、E2F3b は約 1.6 倍増加した。E2F3a と E2F3b のプロモーターでレポーターアッセイを行ったところ、E2F3a プロモーター活性が E1A により約 17 倍増強された。一方で E2F3b プロモーター活性に大きな変化は見られなかった。これより、がん性変化の起きた細胞において、E2F3a の発現が転写レベルで誘導されると考えられた。次に、E2F3a または E2F3b を外来性に導入し、さらに E1A を導入したところ、外来性 E2F3a と E2F3b タンパク質の発現が共に増強した。これより、がん性変化によって E2F3a と E2F3b が native プロモーター非依存的に誘導される機構があると考えられた。そこで、がん性変化によって E2F3a と E2F3b がタンパク質および mRNA レベルで安定化されるかを調べた。プロテアソーム阻害剤 MG132 を加えると、外来性 E2F3b のタンパク質量に変化は見られなかった、E2F3a タンパク質の量が増加した。これより、がん性変化によって E2F3a のプロテアソームによる分解が抑制されている可能性が示唆された。また、転写阻害剤アクチノマイシン D を加え mRNA の半減期を解析したところ、がん性変化の起きた細胞では E2F3a と E2F3b の mRNA が共に安定化されていた。次に、E1A を発現させた細胞において E2F3 を siRNA でノックダウンしたところ、アポトーシス関連遺伝子の発現には大きな変化は認められなかったが、増殖関連遺伝子の発現が減少した。これより、がん性変化によって増加した E2F3a と E2F3b は、主に増殖関連遺伝子の発現誘導に関与する可能性が示唆された。